

## 原 著 (第6回徳島医学会賞受賞論文)

# DHPLC ( Denaturing High Performance Liquid Chromatography ) を用いた男女識別

新 家 利 一<sup>\*</sup>, 奈路田 拓 史<sup>\*†</sup>, 田 村 教 隆<sup>\*</sup>, 采 見 有 紀子<sup>\*</sup>,  
辻 恵 子<sup>\*</sup>, 笹 原 賢 司<sup>\*</sup>, 中 堀 豊<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>徳島大学医学部公衆衛生学講座 (主任: 中堀豊教授)

<sup>†</sup>徳島大学医学部泌尿器科学講座

(平成13年4月27日受付)

性別判定には様々な方法があるが、現在最も汎用され、信頼性の高い方法はX染色体とY染色体に存在するアメロゲニン遺伝子の塩基配列をプライマーに用いた、PCR法に基づく方法である。この方法では、X染色体とY染色体に由来するアメロゲニン遺伝子のPCR産物の長さが異なることを利用して性別判定を行っている。しかしながら、この方法はゲル電気泳動法によるPCR産物の分離が必要であり、PCR産物長を短くできないという問題があった。この問題を解決するために、本研究で我々はDenaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) を用いたヘテロデュプレックス解析による性別判定法を考案した。この方法によってPCR産物長を50bp以下であっても判別可能で、しかも1サンプルの解析に要する時間は7分以下となった。

我々の提案する方法は法医学、出生前診断、考古学、育種学など様々な分野で活用される可能性がある。

男女識別は臨床医学、法医学、育種学など幅広い分野で必要とされている。様々な性別判定法の中でもアメロゲニン遺伝子配列をプライマーとしたPCR法に基づく性別判定が現在幅広く用いられている<sup>14)</sup>。アメロゲニン遺伝子配列を用いたPCR法に基づく性別判定法にはいくつかの利点がある。まず、PCR法を利用するために解析に用いるゲノムDNAが少量でよいこと、またアメロゲニン遺伝子はX染色体とY染色体とで相同な領域に存在するため、男性と女性の双方よりX染色体由来のPCR産物が得られ、これが自動的にPCR反応系の陽性コントロールとなることなどがあげられる<sup>15)</sup>。しかしながら従来のこの方法はX染色体とY染色体に由来するPCR産物の長さが異なることを利用している

ため、電気泳動が不可欠であった。またゲル解像度の問題からPCR産物の長さの下限には限界があった。男女識別は必ずしもDNAの量や質が十分確保される状況下で実施できるとは限らず、PCR産物のサイズが短くても性別が決定できるシステムの構築が重要であると考えられる。

近年Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) が開発された<sup>6,7)</sup>。このシステムはHPLCシステムとヘテロデュプレックス解析を組み合わせたものであり(図1)、single nucleotide polymorphismや塩基配列の挿入および欠失の検出に極めて有効である

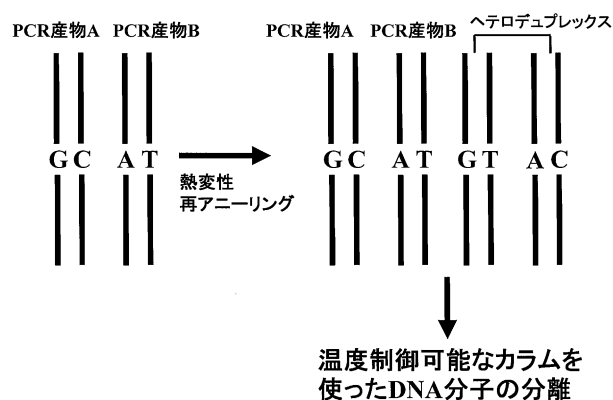


図1. DHPLC法を用いたヘテロデュプレックス解析の概要  
DHPLC法を用いたヘテロデュプレックス解析の概要を示した。PCR産物AとBは塩基配列が1カ所でのみ異なっている(G/A)。PCR産物AとBを混和した後、加熱変性し再び2本鎖DNAを形成させる(再アニーリング)。このときももとのPCR産物AとBのほかに、ミスマッチを有する2種類のヘテロデュプレックスが形成され、合計4種類の2本鎖DNA分子が得られる。もしPCR産物AとBが完全に同一の塩基配列を有していれば、ヘテロデュプレックスは形成されず、加熱変性、再アニーリングを行っても1種類の2本鎖DNA分子しか得られない。これらの2本鎖DNA分子を温度制御可能なカラムを用いたHPLCで分離し、DNA断片中の変異の有無を検索するのがDHPLC法である。

ことが報告されている<sup>6,9)</sup>。

今回我々はヘテロデュプレックス解析による男女識別法を考案し、この解析に DHPLC を用いることによって、簡便でかつ迅速な男女識別システムを構築したので報告する。

## 材料および方法

### ゲノム DNA の抽出

男女各10名、合計20名の末梢血リンパ球より Maniatis ら<sup>10)</sup>の方法に従ってゲノム DNA を抽出した。

### PCR 反応およびヘテロデュプレックスの形成

5 ng のゲノム DNA を鋳型として1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM TrisHCl-buffer (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.001% (w/v) gelatin, 各0.25 mM dNTP, 各1 μM プライマー, 0.1 U Taq Gold DNA polymerase を混和した後、サーマルサイクラーを用いて、94 で9分間の初期変性を行い、引き続き94 で30秒、60 で30秒、72 で1分間のサイクルを35回繰り返し、最後に72 にて10分間加温した。PCR 産物を95 で5分間変性させた後、10 まで30分間かけて徐々に冷却し、ヘテロデュプレックスを形成させた。

### DHPLC によるヘテロデュプレックス解析

DHPLC によるヘテロデュプレックス解析は Underhill らによって報告されている方法に従って行った<sup>6,7)</sup>。ヘテロデュプレックス形成後、おのおのの PCR 産物 2 μl を米国トランスジェノミックス社製 WAVE システムによって解析した。3種類おのおののプライマーセットの場合について、ヘテロデュプレックス解析に適したバッファーグラジェントは WAVEmaker ver 3.3.3

を用いて算出した。

### 従来法による男女識別

Nakahori<sup>4)</sup>らの方法に従って PCR 反応を行い、1% アガロースゲルを用いた電気泳動法にてアメロゲニン遺伝子増幅産物を確認した。

## 結 果

男女各10名の合計20サンプルについて、今回作成した3種類いずれのアメロゲニンプライマーによってもアメロゲニン遺伝子が増幅された。表1に今回用いた3種類のプライマーを示す。X染色体およびY染色体に由来するアメロゲニン遺伝子増幅産物は数塩基の欠失や、塩基置換を除きほぼ同一である。従ってXおよびY染色体に由来するPCR産物は容易にヘテロデュプレックスを形成できる。アメロゲニン遺伝子増幅産物のヘテロデュプレックスを形成した後、DHPLCを用いて性別判定を行った。DHPLCのカラムオープンの温度はAME I と AME II については62℃, AME III については60℃にて解析を行った。3種類のプライマーセットを用いた場合のおのおののクロマトグラムを図2に示す。PCR産物の溶出時間には変動が認められたが、ピークの形状には再現性が認められた。いずれのプライマーセットにおいても容易に男性特異的ピークが観察可能であった。性別判定の結果は解析に用いた20サンプル全てについて、従来法で決定した結果と完全に一致していた。

## 考 察

本研究で我々はアメロゲニン遺伝子配列をプライマー

表1 アメロゲニンプライマーセットとXおよびY染色体に由来するアメロゲニン遺伝子 PCR 産物

プライマーセット	プライマー	塩基配列	PCR 産物の長さ (bp)	XとY染色体に由来するアメロゲニン遺伝子 PCR 産物の違い
AME I	Forward: Amel A# Reverse: Amel B#	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	X: 106 Y: 112	7塩基置換および 6塩基欠失
AME II	Forward: Amel NS1 Reverse: Amel NS2	5'-CCCCTTTGAAGTGGTACCAG 5'-GCATGCCTAATATTTTCAGGG	X: 81 Y: 84	4塩基置換および 3塩基欠失
AME III	Forward: Amel NF Reverse: Amel NR	5'-CTTGCCTCCTAGCATATAAG 5'-CCATCACACACATTCTTCATC	X: 45 Y: 45	1塩基置換

#プライマー Amel A と B は既に報告されているものを用いた<sup>11)</sup>。

表2 SSCP 法と DHPLC 法の特徴の比較

	検出する DNA の種類	1 回で解析できる塩基配列のサイズ	塩基置換の検出効率	その他
DHPLC 法	2 本鎖 DNA のヘテロデュプレックス	800bp まで	95% 以上	ゲル作成が不要 装置が比較的高価
SSCP 法	1 本鎖 DNA	通常数百 bp 以下	80% - 90%	通常ゲル作成が必要

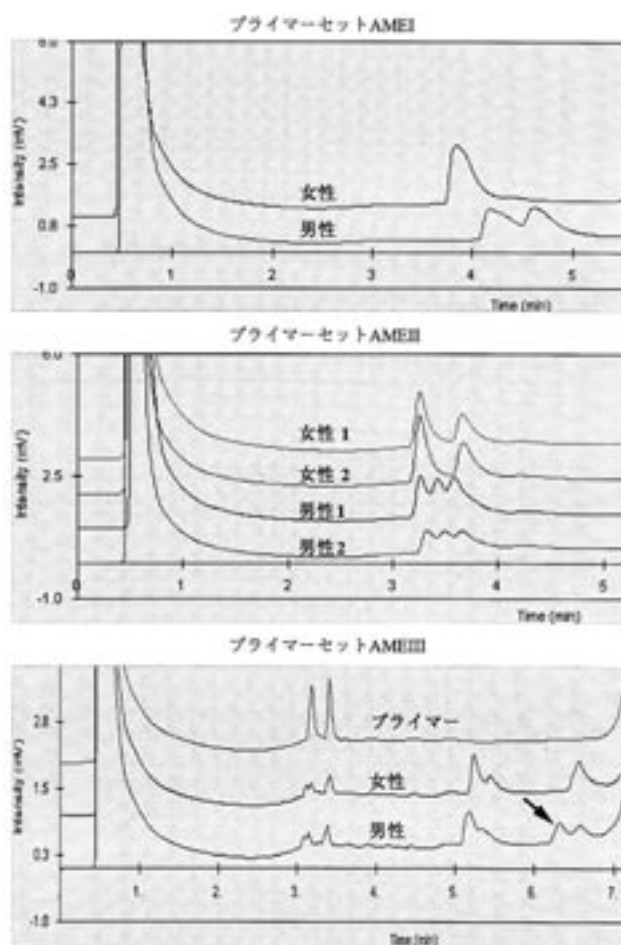


図2. DHPLC 法を用いた男女識別の例  
各アメロゲニン遺伝子プライマーセットを用いて行った男女識別のクロマトグラムを示す。AME I では男性ではピークが2本、女性では1本認められた。AME II では男性ではピークが3本、女性では2本認められた。AME III では男性、女性ともに複数のピークが認められたが、矢印に示すピークは男性にのみ認められた。横軸は溶出時間を、縦軸はDNAの吸光度を表している。

に用いた性別判定システムとヘテロデュプレックス解析を組み合わせる簡便な性別判定法を開発した。

アメロゲニン遺伝子配列を用いたPCR法に基づく性別判定法は解析に用いるゲノムDNAが少量でよく、また男性と女性の双方に存在するX染色体由来のアメロ

ゲニン遺伝子増幅産物が、自動的にPCR反応系の陽性コントロールとなるなどの点で優れた方法である。<sup>14)</sup>

我々はアメロゲニン遺伝子増幅産物のヘテロデュプレックス解析にDHPLC法を用いた。DHPLC法とはヘテロデュプレックスを形成したDNAを特殊なカラムと厳密温度制御が可能なhigh performance liquid chromatography (HPLC) システムを用いて分離する方法である<sup>6,7)</sup>。この方法はsingle nucleotide polymorphism (SNP) や塩基配列の挿入および欠失の検出にきわめて有効であることが報告されている<sup>6,9)</sup>。またこの方法は従来から広く塩基置換等のスクリーニングに用いられているsingle strand conformation polymorphism (SSCP) 法に比べて、長いDNA断片について塩基の変異を検索することができ、かつ検出効率も高いとされる(表2)。

我々の開発した性別判定法は従来法に比べていくつかの利点がある。従来法ではXおよびY染色体に由来するアメロゲニン遺伝子のPCR産物の長さが異なる事を利用していたため、ゲル電気泳動が不可欠であり、ゲルの解像度の制約からPCR産物長の下限に自ずと制約があった。しかし我々の方法はX染色体とY染色体のアメロゲニン遺伝子に由来するPCR産物間で形成されるヘテロデュプレックスをDHPLC法にて検出するため、電気泳動を行わずに性別判定が出来る。したがって我々の方法ではPCR産物長はあまり重要な問題ではなくなった。本研究では45bpのアメロゲニン遺伝子PCR産物であっても性別判定が可能であった。さらにゲルを用いることなく1サンプル当たり7分以下で自動的に解析され、情報はコンピューターハードウェアに蓄えることが出来る。

我々の開発した方法はヘテロデュプレックスを簡便に解析するためにDHPLC法を用いている。今後さらに簡便にヘテロデュプレックスが検出出来る方法が開発されれば、我々のヘテロデュプレックス法を利用した男女識別はさらに迅速で簡便なものになる。

## 結 語

我々は新しく開発した DHPLC 法を用いたヘテロデュプレックス解析に基づく男女識別法を報告した。我々の方法は簡便で応用範囲が広いと考えられる。今後様々な分野での応用が期待される。

本論文の要旨は、第222回徳島医学会学術集会で発表した。

## 文 献

- 1 ) Nakahori, Y. Hamano, K. Iwaya, M. Nakagome, Y.: Sex Identification by Polymerase Chain Reaction Using X-Y Homologous Primer. *Am. J. Med. Genet.*, 39 : 472-473, 1991
- 2 ) Mannuci, A. Sullivan, KM. Ivanov, PL and Gill, P.: Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.*, 106(4) : 190-193, 1994
- 3 ) Mannuci, A. Sullivan, KM. Ivanov, PL. and Gill, P.: Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.*, 106(4) : 190-193, 1994
- 4 ) Sullivan, K. Mannuci, A. Kimpton, CP. and Gill, P.: A rapid and quantitative DNA sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*, 15(4) : 636-638, 1993
- 5 ) Nakahori, Y. Takenaka, O. Nakagome, Y.: A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*, 9(2) : 264-269, 1991
- 6 ) Underhill, PA. Jin, L. Zemans, R. Oefner, PA. et al.: A pre-Columbian human Y chromosome-specific C to T transition and its implications for human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 196-200, 1996
- 7 ) Underhill, PA. Jin, L. Lin, AL. Mehdi, SQ, et al.: Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high performance liquid chromatography. *Genome Res.*, 7 : 996-1005, 1997
- 8 ) Wagner, TMU. Hirtenlehner, K. Shen, P.: Global sequence diversity of BRCA2 : Analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum. Mol. Genet.*, 8(3) : 413-423, 1999
- 9 ) Wagner, T. Stoppa-Lyonnet, D. Fleischmann, E. Muhr, D. et al.: Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics*, 62 : 369-376, 1999b
- 10 ) Maniatis, T. Fritsch, E and Sambrook, J.: *Molecular cloning : a laboratory manual*, 1989
- 11 ) Beraud-Colomb, E. Roubin, R. Martin, J. Maroc, N. et al.: Human beta-globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12,000 years old. *Am. J. Hum. Genet.*, 57(6) : 1267-1274, 1995

## *A Novel Method for Sex Identification by Analysis of a heteroduplex using Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)*

*Toshikatsu Shinka<sup>\*</sup>, Takushi Naroda<sup>\*†</sup>, Takamichi Tamura<sup>\*</sup>, Yukiko Unemi<sup>\*</sup>, Keiko Tsuji<sup>\*</sup>, Kenji Sasahara<sup>\*</sup> and Yutaka Nakahori<sup>\*</sup>*

*<sup>\*</sup> Department of Public Health, and <sup>\*†</sup> Department of Urology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan*

*(Director : Prof. Yutaka Nakahori)*

### SUMMARY

A novel method for sex identification using a denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) system is described. Among many methods for identifying sex, the most popular and credible system has been the polymerase chain reaction (PCR) method using the nucleotide primer sets of the amelogenin gene, which is shared on both the X and Y chromosomes. In this conventional method, the judgment depends on the detection of the size difference between the PCR products derived from the X and Y chromosomes. In this study, we adopted DHPLC to detect the difference by checking heteroduplex formation between the products, which enabled us to shorten the PCR products down to 45 bp and the separation time within 8 minutes. This new system may have a wide application in many different fields such as forensic medicine, prenatal diagnosis, inbreeding of animals and anthropology.

Key Words : Sex identification, amelogenin, heteroduplex, DHPLC